

李 莉, 吴永洁, 王元素. 基于 SSR 标记的同一花序贵州野生白三叶遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(2): 49–53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.011

# 基于 SSR 标记的同一花序贵州野生白三叶遗传多样性分析

李 莉<sup>1</sup>, 吴永洁<sup>1</sup>, 王元素<sup>2</sup>

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001; 2. 贵州省草原监理站, 贵州贵阳 550001)

**摘要:**采用简单重复序列(SSR)分子标记技术,对19份分别来源于同一花序的贵州野生白三叶样品进行遗传多样性及亲缘关系研究。结果表明,利用20对引物共扩增出207个条带,其中178个条带具有多态性。20对引物多态性位点的比例为76.92%~92.31%,平均多态性为85.99%。20对引物对19份白三叶材料SSR的PCR扩增条带的多态信息含量为0.3806~0.4997,平均为0.4632。在相似系数为0.60时,把19份白三叶材料划分为3大类。第1类是W18,最早被分开独立成一类,从SSR标记来看,W18与其余材料的亲缘关系较远。第2类包括W2和W13,表明这2个居群间亲缘关系较近,遗传差异不大。第3类为剩下的16个品种,居群间的遗传关系较复杂。

**关键词:**贵州;野生白三叶;同一花序;遗传多样性;SSR

**中图分类号:**S541+.903.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)02-0049-05

植物在进化过程中,形成了适应外界环境变化的功能性状<sup>[1]</sup>,但研究表明,植物遗传背景是植物功能性状变异的主要来源之一,甚至大于环境因素的影响<sup>[2]</sup>。张莉等研究也提出研究植物性状对环境变化的响应,必须明确遗传背景与环境对植物性状的相对影响,以排除遗传背景的作用<sup>[3]</sup>。

在植物不同花或花序之间存在不同程度的繁殖资源分配和竞争问题,即植株不同部位的花甚至是同一个花序内不同部位花的地位是不平等的,存在明显的位置效应<sup>[4]</sup>,导致同株植物甚至同一花序不同位置的小花、果实和种子的数量、大小、形态及繁殖效率可能存在差异<sup>[5]</sup>。张鹤山等研究表明,不同取样地红三叶的单株花序数和单个花序小花数的变异是体现多样性的重要指标<sup>[6]</sup>。刘左军等统计不同部位头状花

序的生物量投入,并分析了存在于总状花序内资源分配上的结构效应及其对不同生境条件的反应<sup>[4]</sup>。

白三叶是多年生优质豆科牧草,为异花授粉植物,广泛分布于世界各地,在畜牧业发展中起重要作用。吴永洁等采用温室大棚培养,用来源于同一花序的白三叶作为试验材料,研究贵州野生白三叶的形态多样性,以排除环境因素对试验的影响,在同一花序水平上研究形态多样性,可以减少基因漂移和花粉污染等因素的影响,为进一步研究其遗传水平上的多样性提供基础数据<sup>[7]</sup>。目前简单重复序列(SSR)已被广泛应用于各种研究,如遗传多样性分析<sup>[8]</sup>、种质分子身份证的构建<sup>[9]</sup>、遗传连锁图绘制及QTL定位<sup>[10]</sup>、目标性状基因定位和分子标记辅助育种<sup>[11]</sup>等。本研究以贵州省境内19份野生白三叶种质为研究对象,比较同一花序水平上的遗传多样性,可为下一步选育优质高效白三叶新品种提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 2013年5—8月在贵州省范围内收集野生白三叶种子,共收集19份种质,具体收集地点见表1。

收稿日期:2017-08-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260115);贵州省重大科技攻关项目(编号:黔科合重大专项字[2011]6009号)。

作者简介:李 莉(1975—),女,山西大同人,博士,主要从事分子生态学。E-mail:liligznu@163.com。

通信作者:王元素,博士,高级畜牧师,主要从事草地生态学研究。E-mail:wanguansu@sina.com。

transport of sugar and regulation by environmental factors [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 272.

[10] Lee J R, Boltz K A, Lee S Y. Molecular chaperone function of *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2 - A1, encodes a protein similar to phloem lectin [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2014, 443(1): 18–21.

[11] Ding D, Xiao Z X, Xiao H L, et al. Revelation of the early responses of salt tolerance in maize via SSH libraries [J]. Genes & Genomics, 2012, 34(3): 265–273.

[12] Beneteau J, Renard D, Marche L, et al. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2 - A1 phloem lectin in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2010, 153(3):

1345–1361.

[13] Li X, Yang Y Q, Ma L, et al. Comparative proteomics analyses of *Kobresia pygmaea* adaptation to environment along an elevational gradient on the central Tibetan Plateau [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98410.

[14] Pallas V, Gomez G. Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 1–6.

[15] Gómez G, Pallás V. Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(7): 910–913.

表 1 试验材料采集地概况

种源	采样地点	经度	纬度	海拔(m)
W1	台江县台供镇万亩草场	108°18'50.57"E	26°40'15.22"N	638
W2	凤岗县龙泉镇柏梓村	107°43'02.09"E	27°57'44.88"N	731
W3	台江县台供镇大德村	108°15'06.42"E	26°38'34.97"N	750
W4	台江县台供镇南市村	108°18'06.92"E	26°38'51.79"N	755
W5	册亨县秧坝镇秧坝村坝纳组	105°49'19.43"E	24°53'14.84"N	971
W6	黔东南州黄平县新州镇凉风坳半坡	107°53'59.92"E	26°55'02.34"N	984
W7	汇川区董公市镇	106°56'03.89"E	27°45'00.85"N	986
W8	金沙安底乡安底村	106°26'15.14"E	27°23'29.98"N	1 007
W9	台江县方召乡李子村到黄毛地段	108°21'57.56"E	26°39'25.48"N	1 127
W10	黔西林泉王正沟村	105°50'21.49"E	27°00'50.97"N	1 353
W11	兴仁县真武山街道办事处三村叉河组	105°11'10.01"E	25°26'01.38"N	1 355
W12	望谟县打易镇毛坪村上打闹湾组	106°06'28.72"E	25°21'46.07"N	1 364
W13	毕节市七星关历阳山	105°08'18.56"E	27°17'54.97"N	1 509
W14	晴隆县莲城镇五一村南山组	105°12'44.78"E	25°49'19.21"N	1 527
W15	施秉县城关镇小河村	108°20'09.39"E	26°49'09.73"N	1 596
W16	赫章姑妈村	105°08'44.16"E	27°12'43.08"N	1 748
W17	金钟镇路边	104°41'85.90"E	26°76'65.71"N	2 038
W18	金钟村田坎	104°41'62.10"E	26°27'77.06"N	2 130
W19	威宁板底村	104°18'48.90"E	27°22'16.71"N	2 198

1.1.2 温室栽培 于 2014 年 9 月 20 日在贵州省牧草种子检测中心温室大棚内播种。参照吴永洁等的方法<sup>[7]</sup>,从 19 份材料中各选取 1 个果实饱满的花序,将来自同一花序的种子插入有 32 个小格的育苗盘中,每小格播 2 粒种子,3 个月成苗期后,在形态多样性研究的基础上,选择形态上有代表性的幼苗进行 SSR 标记试验。

1.1.3 试验试剂 DNA 提取试剂盒(购自大连宝生物公司);26 对 SSR 引物(由大连宝生物公司合成)。

1.2 白三叶总 DNA 提取

取野生白三叶新生叶片,提取总 DNA。用 0.75% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.3 SSR-PCR 扩增体系与程序

参考牟彤等的白三叶 SSR 分析体系<sup>[12-13]</sup>,通过单因素梯度组合试验,得到优化后最优的白三叶 20 μL 反应体系:模板 20 ng,10 × PCR Bufer 2 μL,Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 2.4 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μL,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.1 μL,上、下游引物均为 0.6 μL(0.1 mmol/μL),用灭菌水补足 20 μL,覆盖矿物油。

1.4 引物筛选

参照 Zietkiewicz 等的研究<sup>[14-15]</sup>,挑选出多样性较高的 26 对 SSR 引物,并将其交由大连宝生物公司合成。从供试材料中选出质量较高且形态性状差异较大的 W11 及 W12 材料对 26 对引物进行筛选,最终选出 20 对多态性好、稳定性高、条带清晰的引物对全部材料进行 PCR 扩增,引物序列见表 2。

1.5 数据处理

对凝胶电泳后获得清晰稳定的 DNA 扩增条带进行统计,在相同迁移位置上的谱带,有带的赋值为“1”,无带的赋值为“0”,建立遗传相似矩阵。通过该矩阵,统计 SSR-PCR 扩增产物总条带数和具有多态性的条带数,用 Excel 计算多态性位点百分率 PPB (PPB = NPB/TNB × 100%,其中 TNB 指 SSR-PCR 扩增的总条带数,NPB 指具有多态性的条带数<sup>[16]</sup>)、标记指数 MI (MI = NPB × PIC)<sup>[17]</sup>、引物多态性信息

含量 PIC [PIC = 2f<sub>i</sub>(1 - f<sub>i</sub>),其中 f<sub>i</sub> 表示有带的所占的频率]。用 NTSYS-PC 2.02 软件计算 Dice 遗传距离 GD [GD = 1 - 2N<sub>ij</sub>/(N<sub>i</sub> + N<sub>j</sub>),其中 N<sub>i</sub> 指材料 i 中出现的扩增片段数,N<sub>j</sub> 指材料 j 中出现的扩增片段数,N<sub>ij</sub>指材料 i 和 j 共有的扩增片段数],用以估计各白三叶种质间的遗传多样性<sup>[16,18]</sup>。根据非加权组平均法(UPGMA)法进行遗传相似性聚类分析<sup>[19]</sup>。

2 结果与分析

2.1 贵州野生白三叶同一花序 DNA 纯度检测

采用 0.75% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 19 份野生白三叶 DNA 进行检测,结果见图 1(图中 1 ~ 19 对应 19 份材料),可见 DNA 的完整性较好,纯度较高。

2.2 贵州野生白三叶同一花序 SSR 扩增产物的多态性分析

本试验筛选出 20 对多态性引物(表 2),共扩增出 207 个条带(表 3),其中 178 个条带具有多态性,引物 POI03 扩增出的条带数最多,为 18 条;引物 POI24 扩增出的条带数最少,仅有 6 个条带。20 对引物多态性位点的比例为 76.92% ~ 92.31%,平均多态性为 85.99%。每对引物的多态性条带数为 6 ~ 15 个,平均每对引物产生 8.9 条多态性带。20 对引物对 19 份白三叶材料 SSR 的 PCR 扩增条带的多态信息含量为 0.380 6 ~ 0.499 7,平均为 0.463 2。不同 SSR 引物的标记指数为 1.980 0 ~ 7.080 0,平均为 4.164 0。引物 POI07、POI08、POI11、POI09、POI05、POI26、POI14、POI16、POI10 和 POI03 扩增条带数较多,达 10 个及以上(图 2),说明这些对引物对白三叶具有较高的扩增效率。

2.3 贵州野生白三叶同一花序 UPGMA 法聚类结果

基于 SSR 分析的遗传相似性系数(表 4),利用 UPGMA 法对 19 份供试白三叶材料之间的遗传关系进行聚类分析。由图 3 可知,在相似系数为 0.60 时,把 19 份白三叶材料划分为 3 大类。第 1 类是 W18,最早被分开独立成一类,从 SSR 标记来看,W18 与其余材料的亲缘关系较远。第 2 类包括 W2 和 W13,表明这 2 个居群间亲缘关系较近,遗传差异不

表 2 SSR 引物名称及其序列

引物	引物序列(5'→3')	引物	引物序列(5'→3')
POI01	AGAAAGGTGAATGATGAAA TCTAATTCCTCCAATAGGG	POI14	TTCAGGCTTCGTAACAACATCAT TGGAGCCGCCAACTTCAT
POI02	TTTTCGCATTGTTTCAGACC CCCTTCTCAACCCACATC	POI15	TATACATGCCCTTTGTTAAATGTGA CTAATACTCGAGAAGCCTCAAGAG
POI03	TGGCTATTACAACCTTGGAGA CGAGGCATACTTGATGATGG	POI16	TGTCAGATGTCATGCATATTTTCAG TTGAAGTGATTAACGAAGAAGGAG
POI04	TATGCTGGTAGATAAACTTAAA TGCTCTGGAGATTGATGG	POI17	ACATTTGAACATGACATCACCGAA TTCTACTTTGAGGCTGAGCTTTGG
POI05	AAGTGTGGACAAGGAAACTAGG TCTCTAGATCACCGGCATTG	POI18	TTTTGTCTAATTGCAGAACCATGG TTTAAGTAACAGGTTGATGCGTAC
POI06	CAGTAAAGGAATCTGTTCAAACCT AAACACCAATCAGACCGGAAA	POI19	ACGGGAGATAATTCATTTCTGAAG GGTCGAGAAATACAACATGCATAC
POI07	GTACCTGGAAATGTTGATT GAGCAGCCATGACCTCTG	POI20	ACATGTCTTTGGATTATTACAGG TCAGGGCACTATAAAATTAGTGTT
POI08	AGAAAGGTGAATGATGAAA TCTAATTCCTCCAATAGGG	POI21	GAAAATCCATGCTTGTAGCACATC TTTCATGGTTTCAGAAAAGCGATC
POI09	TGAAATTGAGATTTAGGATGAA AATCCCTCTGCATATCAAAG	POI22	CATATTGTGATGGAAACAGATA ATAACCATTGTATCATTTGATGA
POI10	AGGGAAGTAGCATTAAGACAA CATTCTGCGATAACATTGAC	POI23	ATCAGTCAGAAATCCGTCGGGC TCGACGCGGAATTGGATAAG
POI11	AGAAAAGAAGAACACCCAGA ACTTTAAGGACATGTTTGCC	POI24	TGGAGTGATGAAGCACAGACACTA ATGCCCAAATGAATAATGATGTC
POI12	CACTTCTCAATATCATAGCGTG TTTCTGAAACAGTTTCCCAT	POI25	ACCTTCTTCTCATTTGCGTTTC TCTAGAATTTCTCGTTTTCATC
POI13	CCACAACACTACAAGTAGGTTT CGTGAATGCTGTTCTATTCT	POI26	AGACCTAAACCAGGCTCTAATGA GTCTTGCTGCTTCTCAACATTCTG

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

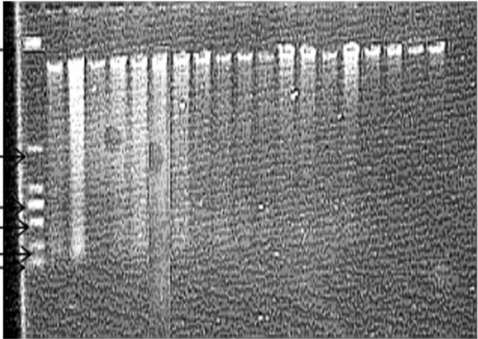


图1 19 份野生白三叶 DNA 电泳结果

表 3 SSR 引物扩增白三叶种质资源

引物	扩增总条带数(个)	产生的多态性条带数(个)	多态性比例(%)	多态性信息含量	标记指数
POI07	10	8	80.00	0.443 3	3.546 4
POI08	11	10	90.91	0.487 5	4.875 0
POI09	14	12	85.71	0.490 8	5.889 6
POI10	13	11	84.62	0.495 2	5.447 2
POI11	15	13	86.67	0.484 2	6.294 6
POI12	7	6	85.71	0.482 3	2.893 8
POI13	7	6	85.71	0.499 7	2.998 2
POI26	13	10	76.92	0.477 0	4.770 0
POI04	9	7	77.78	0.413 8	2.896 6
POI03	18	15	83.33	0.472 0	7.080 0
POI02	7	6	85.71	0.380 6	2.283 6
POI05	13	12	92.31	0.486 2	5.834 4
POI06	9	8	88.89	0.418 6	3.348 8
POI01	7	6	85.71	0.498 6	2.991 6
POI25	8	7	87.50	0.427 2	2.990 4
POI24	6	5	83.33	0.396 0	1.980 0
POI22	9	8	88.89	0.474 0	3.792 0
POI14	12	11	91.67	0.479 6	5.275 6
POI16	11	10	90.91	0.465 4	4.654 0
POI17	8	7	87.50	0.491 3	3.439 1
总数	207	178			
平均值	10.35	8.9	85.99	0.463 2	4.164 0

大。第 3 类为剩下的 16 个品种,居群间的遗传关系较复杂。当相似系数在 0.70 位置时,可将第三类系细分成 3 个聚类,W17 独聚为一类。W11、W14、W12、W16 和 W1 及 W7 聚为一类,表明这 6 个居群白三叶遗传距离较小。其余的白三叶居群聚为一小类。由表 4 可知,19 份白三叶 Nei - Li 相似系数进行聚类与遗传距离具有较好的一致性。

3 讨论

3.1 植物遗传多样性的影响因素

基因与环境共同决定了生物的表型特征,空间分离群体之间的隔离和基因流动的程度决定了遗传差异、生殖隔离和物种形成的潜在能力。植物的花粉与种子类型、散布方式和散布范围会对遗传多样性造成影响<sup>[20]</sup>。风媒传粉的植物与虫媒传粉的植物比花粉(种子)的传播距离远,由其介导的基因流相对较高,遗传多样性也相应会高一些。世代周期短的野生植物群体要比世代周期长的野生植物群体遗传多样性丰

富。植物基因流的大小,在很大程度上取决于植物的繁殖方式和繁殖体的移动方式。异交、混交植物的基因流明显大于自交植物,风媒传粉植物的基因流大于动物传粉和自花授粉植物。基因流有助于提高植物群体的遗传多样性水平,防止种群分化<sup>[21]</sup>。遗传漂变和自然选择都会使群体之间的差异

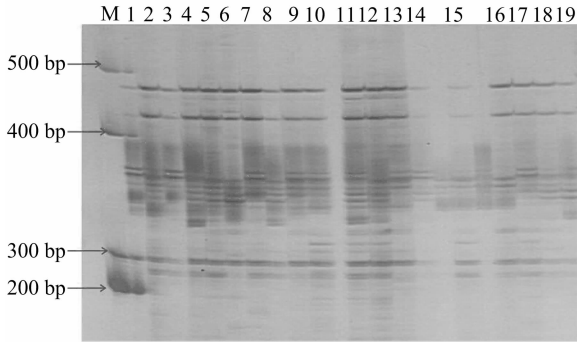


图2 引物 POI03 对 19 份野生白三叶种质 SSR 扩增电泳结果增加,而基因流的作用会使群体之间的差异减小<sup>[22]</sup>。随着人类活动的增加,人为干扰会对植物遗传多样性造成十分显著

而深刻的影响。森林资源的破坏和过度利用、草地过度放牧和垦殖、城镇化和旅游业的发展、外来物种的大量引进和入侵等确定性人为因素是造成现代物种灭绝的最主要原因,尤其是生境丧失、生境破坏及过度利用对物种的生存威胁最为严重<sup>[23]</sup>。

白三叶原产于欧洲和北非,并广泛分布于亚、非、澳、美各洲。在中国亚热带及暖温带地区分布较广泛。在中国西南、东南、东北等地均有野生种分布。白三叶为天然异源四倍体植物,具自交不亲和性,因此,在遗传组成上具有高度杂和的特性,无论是种群内还是种群间皆具有丰富的遗传变异,其形态特征可塑性较大<sup>[24]</sup>。白三叶形态变异与地理起源呈较密切的相关性,而不同起源的白三叶亦出现了相似的遗传分化,原产于欧洲的白三叶形态朝不同方向的进化趋势明显<sup>[25]</sup>。

表 4 19 份贵州同一花序野生白三叶基于 SSR 分析遗传距离

种源	遗传距离																		
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19
W1	0																		
W2	0.380 8	0																	
W3	0.345 4	0.321 4	0																
W4	0.330 4	0.329 4	0.243 3	0															
W5	0.273 9	0.253 5	0.221 1	0.291 6	0														
W6	0.302 6	0.314 1	0.203 0	0.230 1	0.227 7	0													
W7	0.173 0	0.296 9	0.306 5	0.293 0	0.219 1	0.220 5	0												
W8	0.349 4	0.303 7	0.199 3	0.247 3	0.225 1	0.170 0	0.247 3	0											
W9	0.291 8	0.393 3	0.290 4	0.266 3	0.308 3	0.213 9	0.309 3	0.283 6	0										
W10	0.314 2	0.358 2	0.268 9	0.287 6	0.275 5	0.243 2	0.276 9	0.276 9	0.338 1	0									
W11	0.202 5	0.275 9	0.274 4	0.271 9	0.209 1	0.220 5	0.191 9	0.237 2	0.255 8	0.235 2	0								
W12	0.055 4	0.393 3	0.323 5	0.331 5	0.297 2	0.315 0	0.195 2	0.350 3	0.282 2	0.315 4	0.205 0	0							
W13	0.396 5	0.253 2	0.319 5	0.363 0	0.315 4	0.354 1	0.260 0	0.335 2	0.396 3	0.409 0	0.339 2	0.409 0	0						
W14	0.216 5	0.333 3	0.257 5	0.296 9	0.233 1	0.234 0	0.286 4	0.303 7	0.280 8	0.313 2	0.158 1	0.209 0	0.355 0	0					
W15	0.353 0	0.339 5	0.231 3	0.219 1	0.268 9	0.247 3	0.270 4	0.266 4	0.254 2	0.330 8	0.302 4	0.353 8	0.327 1	0.306 4	0				
W16	0.042 5	0.354 1	0.319 4	0.327 4	0.271 4	0.310 9	0.181 3	0.346 1	0.278 1	0.334 0	0.191 1	0.046 3	0.354 9	0.214 8	0.361 3	0			
W17	0.322 4	0.437 8	0.342 9	0.253 6	0.373 6	0.261 3	0.285 0	0.335 7	0.334 8	0.312 3	0.328 5	0.312 3	0.391 8	0.321 4	0.350 3	0.319 4	0		
W18	0.448 9	0.368 1	0.392 5	0.273 1	0.413 4	0.322 3	0.400 5	0.336 6	0.360 0	0.396 8	0.388 2	0.435 0	0.333 8	0.380 0	0.352 1	0.444 0	0.344 3	0	
W19	0.361 1	0.293 0	0.259 9	0.227 1	0.205 1	0.226 1	0.267 9	0.213 2	0.350 3	0.283 6	0.237 2	0.338 8	0.335 2	0.271 9	0.309 4	0.334 7	0.302 5	0.360 1	0

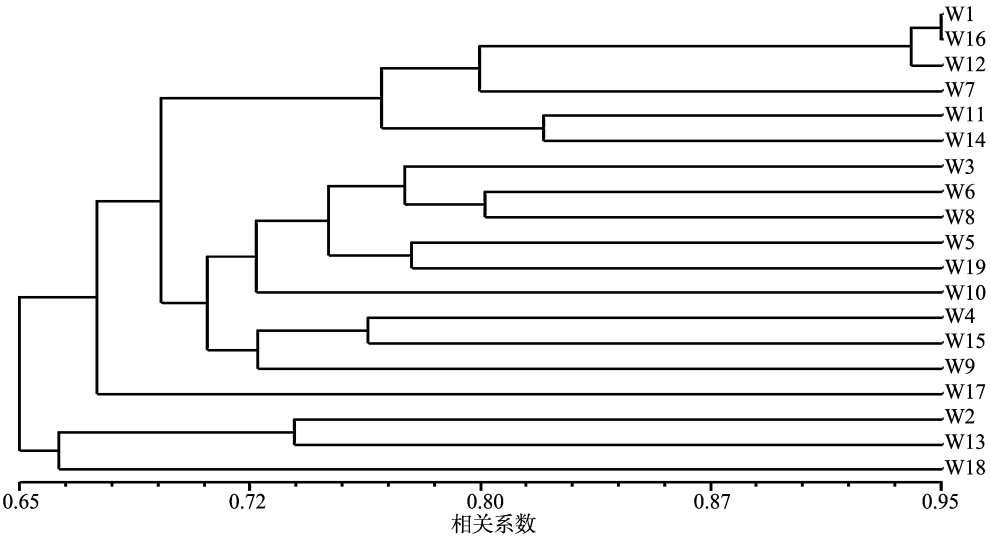


图3 19 份同一花序野生白三叶 SSR 分子标记基于 Nei-Li 的相似系数的 UPGMA 聚类

### 3.2 贵州野生白三叶在同一花序水平上的遗传多样性

本研究表明,基于 SSR 标记的聚类结果与吴永洁等对表型性状数据的聚类结果<sup>[7]</sup>并不完全一致。基于表型性状数据的聚类分析中材料 W7 独自成一类,基于 SSR 分析时 W18 最早被分开独立成一类,但 2 种分析结果都与环境的相关性较小。说明环境因素并不是影响贵州野生白三叶居群间基因交流的关键因素。造成这 2 个结果不一致的原因可能有:表型性状包括的内容十分广泛,本研究所选取的 10 个表型性状,只能在一定程度上揭示其表型多样性。还有可能因为所选 SSR 引物不能揭示白三叶整个基因组的变异情况,而有些发生在 DNA 水平的变异(如内含子的变异)不一定造成表型性状的变化。

DNA 标记位点的引物多态性信息含量的平均值即平均 PIC 值,可用于评价群体的遗传多样性水平,即群体的平均 PIC 值越大,表明群体的 DNA 标记位点变异程度越大,群体的遗传多样性越丰富<sup>[26]</sup>。本研究中 19 份同一花序的贵州野生白三叶平均 PIC 值为 0.463 2,略小于 22 份贵州野生白三叶居群间的平均 PIC 值 0.474 8<sup>[27]</sup>,表明 22 份白三叶居群间的遗传多样性比 19 份同一花序白三叶的遗传多样性高,这与 Nei-Li 相似系数一致,前者相似系数范围为 0.63~0.90<sup>[27]</sup>,后者范围为 0.65~0.95,即总体上后者之间的亲缘关系较前者近。造成这个结果的原因可能有:(1)22 份白三叶居群包含的海拔区域更广泛,白三叶生长地的小气候更复杂多样,而导致其变异水平偏高;(2)居群间白三叶可能通过杂交扩展了其遗传基础,来自同一花序的白三叶类似于自交的植物或自花授粉,亲缘关系较近而降低了物种的遗传多样性。

研究同一花序的白三叶,因其遗传物质只来自母本,可以更加精确地了解纯种白三叶的遗传信息。22 份白三叶居群间的遗传多样性比 19 份同一花序白三叶的遗传多样性高。

本研究将贵州不同地区来源的野生白三叶种植于同一地点(温室大棚内),使其生长在相同生境下,消除环境饰变的影响,以了解由基因决定的表型性状变异情况。

### 参考文献:

- [1] Meng T T, Ni J, Wang G H. Plant functional traits, environments and ecosystem functioning[J]. Journal of Plant Ecology: Chinese Version, 2007, 31(1): 150-165.
- [2] Zhang S B, Slik J, Zhang J L, et al. Spatial patterns of wood traits in china are controlled by phylogeny and the environment[J]. Global Ecology and Biogeography, 2011, 20(2): 241-250.
- [3] 张莉, 温仲明, 苗连朋. 延河流域植物功能性状变异来源分析[J]. 生态学报, 2013, 33(20): 6543-6552.
- [4] 刘左军, 杜国祯, 陈家宽. 黄帚橐吾花序结构的资源配置与环境的关系[J]. 植物生态学报, 2003, 27(3): 344-351.
- [5] 樊宝丽, 赵志刚, 孟金柳, 等. 露蕊乌头(*Aconitum gymnanthum* Maxim)花序内位置依赖的性分配[J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2909-2915.
- [6] 张鹤山, 陈明新, 田宏, 等. 野生红三叶种群表型性状变异研究[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 44-49.
- [7] 吴永洁, 王元素, 李莉. 喀斯特地区同一花序白三叶形态多样性研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2016, 39(5): 38-43.

- [8] 王燕龙, 单雷, 付春, 等. 不同 SSR 标记检测技术及其在花生栽培种遗传多样性分析中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 96-105.
- [9] 马琳, 刘海珍, 陆徐忠, 等. 130 份甘蓝型油菜种质分子身份证的构建[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 231-239.
- [10] 王峰, 官春云. 甘蓝型油菜遗传图谱的构建及单株产量构成因素的 QTL 分析[J]. 遗传, 2010, 32(3): 271-277.
- [11] 杨娟, 王雯, 沈火林. 辣椒恢复基因 SSR 标记定位及分子标记辅助选择育种[J]. 中国瓜菜, 2010, 23(5): 1-5.
- [12] 牟彤. 白三叶化学诱变后代遗传变异的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 28-58.
- [13] 张婧源. 世界范围野生白三叶种质资源的遗传多样性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013: 41-61.
- [14] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [15] Kölliker R, Jones E S, Drayton M C, et al. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(2): 416-424.
- [16] 车永和, 李立会, 何蓓如. 冰草属植物遗传多样性取样策略基于醇溶蛋白的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 216-221.
- [17] George J, Dobrowolski M P, Van-Zijil-de-Jong E, et al. Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by SSR polymorphisms[J]. Genome, 2006, 49(8): 919-930.
- [18] Roldan-Ruiz I, Dendaau J, Van Bockstaele E, et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.) [J]. Molecular Breeding, 2000, 6(2): 125-134.
- [19] Rohlf F J. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.0) [Z]. Exter Software, 1994.
- [20] Hamrick J L, Godt M W. Breeding and genetic resources [M]. Sunderland: Sinauer, 1990.
- [21] Slatkin M. Gene flow and geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236(4803): 787-792.
- [22] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传, 2004, 26(3): 377-382.
- [23] Lande R. Genetics and demography in biological conservation [J]. Science, 1988, 241(4872): 1455-1460.
- [24] Voisey C R, White D R, Wigley P J, et al. Release of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: an ecological perspective [J]. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4(4): 475-481.
- [25] 李州, 彭燕, 张婧源, 等. 白三叶种质资源形态变异与地理起源的关系[J]. 草业科学, 2012, 29(11): 1706-1714.
- [26] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [27] 李莉, 吴永洁, 王元素. 基于 SSR 标记的贵州野生白三叶遗传多样性分析[J]. 种子, 2017, 36(11): 4-9.